

Ostatci sulfonamida u mesu i mesnim proizvodima tijekom trogodišnjeg razdoblja



Nina Bilandžić*, Petra Vrkljan, Božica Solomun Kolanović,
Ivana Varenina, Ines Varga, Marina Krpan i Mirjana Hruškar

Uvod

Sulfonamidi su sintetički bakteriostatski antimikrobnici širokog spektra djelovanja (Galarini i sur., 2011.) i prvi su uspješno sintetizirani selektivno toksični antimikrobni lijekovi širokog spektra djelovanja. Učinkoviti su u liječenju infekcija Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* i *Enterobacter*), a i u liječenju vrsta *Chlamydia*, gljivica *Pneumocystis carinii* i protozoa *Toxoplasma gondii*. Ne pokazuju ni inhibicijsku aktivnost kod *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia* vrsta. Sulfonamidi se razlikuju u jačini, ali ne i u spektru antimikrobne aktivnosti (Tačić i sur., 2017.). Prema farmakokinetičkim svojstvima, sulfonamidi se dijele u sljedeće skupine: sulfonamidi koji se iz crijeva slabo upijaju (sulfagvanidin, sukcinilsulfatiazol), sulfonamidi koji se iz crijeva dobro upijaju, brzo prodiru u tkiva i tjelesne tekućine te se mokraćom izlučuju (sulfadimidin, sulfafurazol,

sulfadiazin, sulfametiazol, sulfazomidin), sulfonamidi koji se dobro upijaju iz crijeva, ali se sporo mokraćom izlučuju (sulfametoksazol, sulfafenazol, sulfadimetoksin, sulfametoksipiridazin, sulfametoksidiazin), sulfonamidi vrlo dugog djelovanja (sulfometopirazin, sulfadoksin) te sulfonamidi za posebnu namjenu poput plinske gangrene i ulceroznoga kolitisa (sulfasalazin, marfanil) (Campbell, 1999.).

Sulfonamidi djeluju tako da inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina bakterija (Šeol i sur., 2010.). Strukturni su analozi para-aminobenzojeve kiseline, polarne molekule s amfoternim svojstvima (Varenina i sur., 2016.). Otkriće prontosila (*Prontosil rubrum*) u ranim 30-tim godinama 20. stoljeća predstavlja početak razvoja kemoterapije. Prontosil, pod utjecajem staničnog enzima u čovjekovom tijelu metabolizira u sulfonamid (Tačić i sur., 2017.). Kao kompetitivni antagonisti para-aminobenzoje-

Dr. sc. Nina BILANDŽIĆ*, (dopisni autor, e-mail: bilandzic@veinst.hr), dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; Petra VRKLJAN, mag. ing. techn. aliment., Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, dipl. ing. preh. tehnol., dr. sc. Ivana VARENINA, dipl. ing. biotehnol., Ines VARGA, mag. primj. kem., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Marina KRPAN, dipl. ing. preh. tehnol., docentica, dr. sc. Mirjana HRUŠKAR, dipl. ing. biotehnol., redovita profesorica, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

ve kiseline sulfonamidi onemogućuju njezino korištenje u sintezi folne kiseline (Campbell, 1999.). Karakterizira ih kratko djelovanje, biotransformacija u jetri i brzo izlučivanje iz organizma.

Negativni učinci na ljude očituju se u poremećaju urinarnog trakta, reakcijama preosjetljivosti i izazivaju trombocitopeniju, anemiju i različite promjene na koži (Šeol i sur., 2010.). Europska komisija je definirala najvišu dopuštenu količinu (NDK) sulfonamida (sve tvari koje pripadaju skupini sulfonamida) od 100 µg/kg za mišiće, masno tkivo, bubrege, jetru i mlijeko (EC, 2010.), ali NDK u mesnim proizvodima nije definiran. Članice Europske unije (EU) imaju obvezu praćenja koncentracija sulfonamida u hrani životinjskog podrijetla u okviru nacionalnih planova praćenja ostataka veterinarskih lijekova i drugih tvari u živim životinjama i životinjskim proizvodima propisanim Direktivom Vijeća 96/23/EZ (EC, 1996.)

Danas se sulfonamidi u hrani određuju nizom različitih analitičkih metoda. Kao jednostavne, brze i osjetljive orijentacijske metode primjenjuju se mikrobiološki testovi (Janošová i sur., 2007., Schneider i sur., 2009.) i imunoenzimski testovi (Zhang i Wang, 2009., Galarini i sur., 2011.). Kvantifikacija i potvrda povišenih koncentracija sulfonamida danas se najčešće provodi tekućinskom kromatografijom kombiniranom s tandemskom spektrometrijom masa LC-MS/MS (Stubbings i Bigwood, 2009., García-Galán i sur., 2010., Yu i sur., 2011., Economou i sur., 2012.).

Svrha ovog rada je praćenje koncentracija sulfonamida u mesu svinja i goveda te u različitim mesnim proizvodima tijekom tri godine. U tu svrhu je korištena orijentacijska imunoenzimska ELISA, metoda koja je validirana i provjerena za svoju namjenu. Dobivene koncentracije su uspoređene s rezultatima sulfonamida određenim u EU.

Materijali i metode

Uzorkovanje mesa i mesnih proizvoda

U periodu od tri godine 2015., 2016. i 2017. sakupljeno je ukupno 381 uzorak mesa svinja i goveda te ukupno 154 mesnih proizvoda, odnosno mesnih narezaka, pašteta, šunki i kobasica. Uzorci su sakupljeni u trgovačkim lancima na području grada Zagreba. Uzorci su do laboratorija transportirani na hladnom. U laboratoriju su podijeljeni u manje komade, označeni i pohranjeni na -18 °C do analize.

Reagensi i standardi

Za određivanje sulfonamida korišten je test Multi-Sulfonamides EIA proizvođača Euro-Proxima (Arnhem, Nizozemska). Kit sadrži mikrotitarsku pločicu (96 jažica), pufer za razrjeđivanje, pufer za ispiranje, otopinu supstrata, stop otopinu, otopinu enzim-konjugata, liofilizirano antitijelo, otopine standarda različitih koncentracija (0,125; 0,25; 0,5; 0,8; 2,5; 5,0 ng/mL) i nulti standard (0 ng/mL). Korišteni su standardi sulfametazina, sulfamerazina, sulfisoksazola, sulfadiazina i sulfakloropiridazina proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD). Bazna otopina sulfonamida koncentracije 1000 µg/mL pripremljena je otapanjem pojedinog analita u metanolu, odnosno za analit sulfadiazin otapanjem u 1 M NaOH. Otopine radnih standarda pripremljene su razrjeđivanjem baznih otopina u metanolu. Radni standardi sulfonamida pripremljeni su u koncentracijama 50 i 5 µg/mL. Bazne otopine pohranjene su na temperaturi od -18 °C, a radni standardi od +2 do +8 °C.

U pripremi i pročišćavanju uzoraka za određivanje sulfonamida korištene su sljedeće kemikalije: etil acetat, izooktan, triklormetan, metanol i kalij dihidrogenfosfat proizvođača Merck (Darmstadt, Njemačka), ultračista voda dobivena sustavom za pročišćavanje

Merck Millipore (Darmstadt, Njemačka), natrij hidrogenfosfat i natrij klorid proizvođača Kemika (Zagreb, Hrvatska).

Instrumenti

Za pripremu analita i uzoraka za analizu korišteni su sljedeći instrumenti: tehnička vaga ($\pm 0,001$ g) model EW 220-3NM, Kern (Balingen, Njemačka), aparat za usitnjavanje uzoraka Waring Commercial Blender 7011HS (Hartford, SAD), vorteks miješalica IKA ultra turrax model T 18 digital, IKA®-WERKE (GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka), centrifuga model Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Njemačka), sustav za uparavanje tekućim dušikom s kupelji N-EVAP® model 112, Organomation Associates Inc. (Berlin, MA, SAD) i Ika vorteks model MS2 Minishaker, IKA®-WERKE (Staufen, Njemačka). Optička gustoća mjerena je pomoću spektrofotometra, mikročitača Tecan model Sunrise Absorbance Reader Tecan (Austria GmbH, Salzburg, Austrija).

Priprema uzoraka

Odvaže se 1 g homogeniziranog uzorka (buđola, zimsko, mesni doručak, pašteta) u plastičnu epruvetu te doda 5 mL etil acetata. Uzorci se vorteksiraju 30 minuta, a potom centrifugiraju na 2000 x g pri 21 °C, 10 minuta. Otpipetira se 1 mL supernatanta u čistu epruvetu i upari do suha u blagoj struji dušika pri 50 °C. Ostatci rezidua otope se u 1 mL fosfatnog pufera. Dobivena otopina od masti se dodatkom 1 mL izooktan/triklormetana (2:3; v:v), lagano vorteksira i centrifugira 5 minuta na 2000 x g na 21 °C. Nakon centrifugiranja otpipetira se 100 µL supernatanta u čistu epruvetu i doda 300 µL fosfatnog pufera. U jažice se pipetira 50 µL dobivene otopine.

Postupak ELISA testa

ELISA test je proveden prema uputama proizvođača Euro-Proxima.

Uporabom spektrofotometra mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 450 nm.

Validacija metode

Postupak validacije metode proveden je prema kriterijima za orijentacijske metode sukladno Odluci Komisije 2002/657/EC (EC, 2002.a). U postupku validacije određeni su sljedeći parametri: selektivnost (specifičnost), sposobnost detekcije ($CC\beta$), iskorištenje, ponovljivost i preciznost, granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ). Validacija metode provedena je u rasponu koncentracija od 0,125 do 5 ng/mL. U validaciji mesnih proizvoda korišteni su uzorci mesnih proizvoda kobasice, mesnog doručka, paštete i dimljene šunke.

Selektivnost (specifičnost) je određena analiziranjem 25 uzoraka mesa, odnosno proizvoda bez obogaćenja i 20 uzoraka s obogaćenjem na koncentraciji od 50 µg/mL. Granica odlučivanja ($CC\alpha$) dobivena je zbrajanjem srednje vrijednosti koncentracija slijepe probe i konstante k koja je jednaka 3. Sposobnost detekcije ($CC\beta$) dobivena je množenjem vrijednosti 1,64 sa standardnom devijacijom obogaćenih uzoraka te se dobivena vrijednost pribroji prethodno izračunatoj vrijednosti $CC\alpha$.

Ukupno iskorištenje i ponovljivost rezultata izražena kao koeficijent varijacije rezultata CV % izračunati su iz dobivenih vrijednosti obogaćenih uzoraka mesa i proizvoda na 3 koncentracijske razine, 25, 50 i 100 µg/kg, odnosno 50, 100 i 150 µg/kg. Ponavljanjem analize od strane 3 različita analitičara izračunata je unutarlaboratorijska reproducibilnost. Granica detekcije (LOD) računata je zbrajanjem srednje vrijednosti koncentracija slijepih uzoraka i 3 standardne devijacije uzorka, odnosno za granicu kvantifikacije (LOQ) 10 standardnih devijacija uzoraka.

Statistička analiza

Računalni program Statistica 10 (StatSoft® Inc., Tulsa, SAD) korišten je u statističkoj analizi dobivenih koncentracija sulfonamida. Utvrđene koncentracije predstavljaju sumu pet sulfonamida i izražene su kao srednja vrijednost (SV) ± standardna pogreška (SP), minimalna i maksimalna koncentracija. Za koncentracije sulfonamida koje su izmjerene ispod LOD vrijednosti, odnosno u mesu ispod 2,9 µg/kg te mesnim proizvodima ispod 0,63 µg/kg dodijeljene su vrijednosti od ½ LOD te su kao takve uključene u statistički izračun (Clarke, 1998.).

Rezultati i rasprava

Nakon primjene antibiotika u liječenju različitih bolesti domaćih životinja ostaci se mogu naći u njihovim tkivima ovisno o karenci. Sulfonamidi, odnosno njihovi metaboliti izlučuju se u bubrege, jetru, mišiće pa tako mogu završiti i u mesnim proizvodima. Iz tih razloga je važno praćenje ostataka u hrani životinjskog podrijetla (Mulalić i sur., 2006.). Jedna od boljki današnje velike uporabe antibiotika, odnosno sulfonamida je pojava rezistentnosti u životinja i ljudi. Izvještaj Europske agencije za sigurnost hrane i Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti

za 2016. godinu pokazuje da su izolati *Salmonella* spp. i *E. coli* iz mesa brojlera i purana rezistentni na sulfonamide, ampicilin, florokinolone i tetracikline. U izolatima ljudi ustvrđen je veliki postotak od 34,64% rezistencije *Salmonella* spp. na sulfonamide, odnosno sulfametazol kao i rezistencija *S. typhimurium* od čak 50,0% na sulfonamide (EFSA, 2018.).

U ovome radu koncentracije sulfonamida u mesu i mesnim proizvodima određivane su ELISA metodom koja je validirana prema postupcima propisanim Odlukom Komisije 2002/657/EZ za orijentacijske metode (EC, 2002.a). U Tabeli 1 prikazani su izračuni validacijskih parametara selektivnost/specifičnost, preciznost i ponovljivost, iskorištenje, granična koncentracija CC α sposobnost dokazivanja CC β , granica detekcije LOD, granica kvantifikacije LOQ.

Određene CC β vrijednosti za meso i mesne proizvode su 60,0, odnosno 11,0 µg/kg niže su od NDK vrijednosti (100 µg/kg) čime je potvrđena selektivnost/specifičnost metode. Ukupna iskorištenja od 80,2 i 66,9% za obje vrste uzoraka su unutar preporučenog raspona od 50 do 120%. Koeficijenti varijacije od 17,4 i 18,6% u unutarlaboratorijskim uvjetima ponovljivosti rezultati su određivanja ponovljivosti i preciznosti i unutar su

Tabela 1. Validacijski parametri ELISA metode za određivanje sulfonamida u mesu i mesnim proizvodima.

Vrsta uzoraka	CC β (µg/kg)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Obogaćenje (mg/kg)	Iskorištenje (%)	CV (%)
Meso	60,0	2,90	5,70	25	99,5	18,4
				50	87,2	16,6
				100	53,9	17,1
				Ukupno	80,2	17,4
Mesni proizvodi	11,0	0,63	2,87	50	64,2	17,3
				100	74,9	21,2
				150	61,6	17,3
				Ukupno	66,9	18,6

dopuštene granice odstupanja (- 50% do + 20%). Određene su granice detekcije LOD u mesu i proizvodima od 2,90 i 0,63 µg/kg te granice kvantifikacije LOQ 5,70 i 2,87 µg/kg. Utvrđeni validacijski parametri zadovoljavaju kriterije propisane Odlukom Komisije 2002/657/EZ za orijentacijske metode (EC, 2002.a).

Koncentracije sulfonamida u uzorcima svinjskog i goveđeg mesa te mesnih proizvoda (naresci, kobasice, šunke, paštete) sakupljenih u periodu od 2015. do 2017. godine prezentirani su u Tabeli 2. U ukupno 535 analiziranih uzoraka sulfonamidi su određeni u rasponu od 0,32 do 38,9 µg/kg. Nije bilo niti jednog uzorka s vrijednostima većim od NDK vrijednosti. Najviša koncentracija od 38,9 µg/kg izmjerena je u uzorku svinjskog mesa u 2015. godini. Ukupne srednje vrijednosti koncentracija sulfonamida u mesu su određene iznad LOD vrijednosti samo u 2015. godini

dok su za ostale dvije godine praćenja ispod LOD vrijednosti. Ukupne srednje vrijednosti za mesne proizvode izmjerene su u većem rasponu od 1,45 do 2,06 µg/kg, odnosno iznad LOD vrijednosti od 0,63 µg/kg. Ustvrdeni rezultati ukazuju da se primjena sulfonamida u liječenju životinja namijenjenih prehrani propisno provodi pazeći na propisanu karenciju lijeka, odnosno njegovo potpuno izlučivanje iz tkiva životinja prije korištenja za prehranu ljudi.

U prijašnjem istraživanju koncentracija sulfonamida u mesu i mesnim proizvodima u Hrvatskoj također su ustvrđene niske koncentracije od 2,76 µg/kg u mesu, odnosno od 1,91 do 2,38 µg/kg u mesnim proizvodima (Bilandžić i sur., 2011.). U istraživanju sulfonamida u mesu u Italiji ustvrđene su koncentracije veće od 250 µg/kg u dva uzorka goveđeg mesa (Galarini i sur., 2011.).

Tabela 2. Koncentracije sulfonamida u mesu i mesnim proizvodima sakupljenim u periodu 2015. - 2017.

Vrsta uzoraka	2015.			2016.			2017.		
	N	SV ± SE (µg/kg)	Min-Maks (µg/kg)	N	SV ± SE (µg/kg)	Min-Maks (µg/kg)	N	SV ± SE (µg/kg)	Min-Maks (µg/kg)
Svinjsko meso	79	3,42 ± 0,54	1,43 - 38,9	72	1,82 ± 0,15 ^a	1,45 - 8,76	68	1,87 ± 0,18 ^a	1,45 - 12,3
Goveđe meso	52	2,69 ± 0,29 ^a	1,45 - 11,8	60	1,85 ± 0,19 ^a	1,45 - 10,5	50	3,68 ± 0,91 ^a	1,45 - 36,1
Ukupno meso	131	3,06 ± 0,42	1,43 - 38,9	132	1,84 ± 0,17^a	1,45 - 10,5	118	2,78 ± 0,55^a	1,45 - 36,1
Paštete	16	1,78 ± 0,21	0,91 - 3,78	14	1,59 ± 0,32	0,65 - 4,24	14	1,04 ± 0,21	0,32 - 3,16
Naresci	8	2,39 ± 0,25	1,60 - 3,60	10	1,02 ± 0,18	0,32 - 2,36	8	1,03 ± 0,18	0,32 - 1,85
Šunke	12	1,97 ± 0,26	1,01 - 4,19	10	1,75 ± 0,71	0,32 - 7,80	14	1,85 ± 0,36	0,32 - 5,52
Kobasice	12	2,08 ± 0,25	1,14 - 4,08	16	1,43 ± 0,24	0,32 - 4,31	20	3,20 ± 1,87	0,32 - 37,3
Ukupno proizvodi	48	2,06 ± 0,24	0,91 - 38,9	50	1,45 ± 0,36	0,32 - 4,31	56	1,78 ± 0,66	0,32 - 37,3
Ukupno meso i proizvodi	179	2,83 ± 0,26	0,91 - 38,9	182	1,73 ± 0,10	0,32 - 10,5	174	2,44 ± 0,35	0,32 - 37,3

^a srednje vrijednosti manje od LOD = 2,9 µg/kg

U okviru nacionalnih planova praćenja ostataka veterinarskih lijekova propisanih Direktivom Vijeća 96/23/EZ (EC, 1996.) u 2013., 2014. i 2015.

godini, članice EU su prijavile povišene koncentracije sulfonamida u 76, 67 i 92, odnosno ukupno 235 uzorka hrane životinjskog podrijetla (Tabela 3). Među

Tabela 3. Broj nesukladnih rezultata sulfonamida na razini EU u okviru nacionalnih programa praćenja ostataka veterinarskih lijekova u razdoblju 2013. - 2015.

Godina	Vrsta životinje	Broj nesukladnih rezultata	Članica EU koja je prijavila nesukladan rezultat
2013.	govedo	18	Belgija, Italija, Francuska, Njemačka, Ujedinjeno Kraljevstvo
	svinja	32	Belgija, Italija, Estonija, Francuska, Grčka, Nizozemska, Njemačka, Rumunjska, Ujedinjeno Kraljevstvo
	ovce/koze	19	Estonija
	perad	3	Bugarska
	jaja	4	Cipar, Francuska, Hrvatska, Ujedinjeno Kraljevstvo
	Ukupno	76	
2014.	govedo	18	Hrvatska, Francuska, Italija, Poljska
	svinja	30	Austrija, Belgija, Cipar, Irska, Francuska, Njemačka, Ujedinjeno Kraljevstvo
	ovce/koze	16	Francuska, Španjolska, Ujedinjeno Kraljevstvo
	zečevi	1	Italija
	akvakultura	1	Italija
	jaja	1	Francuska
Ukupno	67		
2015.	govedo	12	Estonija, Francuska, Italija, Poljska
	svinja	19	Austrija, Belgija, Cipar, Češka, Estonija, Francuska, Italija, Njemačka, Poljska, Ujedinjeno Kraljevstvo
	ovce/koze	51	Estonija, Francuska
	akvakultura	2	Irska
	perad	1	Francuska
	jaja	3	Estonija, Francuska, Grčka
	zečevi	4	Francuska, Italija
	Ukupno	92	

nesukladnim uzorcima tijekom tri godine prijavljeno je ukupno 50, 48 i 31 goveđeg mesa i svinjskog mesa u zemljama EU: Austriji, Belgiji, Ciparu, Češkoj, Hrvatskoj, Irskoj, Italiji, Estoniji, Francuskoj, Grčkoj, Nizozemskoj, Njemačkoj, Poljskoj, Rumunjskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu (EFSA, 2015., 2016., 2017.). Ostali nesukladni rezultati su ukupno gledajući sve tri godine činili: 86 ovce/koze, 4 perad, 5 zečevi, 2 akvakultura i 8 jaja. Najveći broj nesukladnih uzoraka u 2015. godini čini s 55,4% ovčje, odnosno kozje meso (EFSA, 2017.). U 2014. godini u Hrvatskoj je utvrđen nesukladni uzorak goveđeg mesa na sulfadiazin (EFSA, 2016.). Tijekom tri promatrane godine najveći broj nesukladnih koncentracija u goveđem mesu, odnosno svinja određen

je za sulfonamide: sulfadiazin 12 i 36, sulfadimetoksin 6 i 19, sulfametazin 3 i 14, sulfadimidin 4 i 4, sulfametoksipiridin 1 i 2, sulfadoksin 6 (samo goveđe), sulfamerazin 4 (samo goveđe), sulfatiazol 4 (samo ovčje) (EFSA, 2015., 2016., 2017.). Sulfadiazin je sulfonamid za koji je utvrđeno najviše nesukladnih rezultata, ukupno 185 tijekom razdoblja 2013. - 2015.

U okviru drugih službenih uzorkovanja, a koji nisu u okviru nacionalnih planova praćenja ostataka sulfonamida, zemlje članice su u 2015. godini prijavile nesukladne rezultate za sljedeće sulfonamide u mesu: goveda - sulfadiazin (Italija), sulfametazin i ukupni sulfionamidi (Njemačka); svinje - sulfadiazin (2), sulfadoksin i

Tabela 4. Uzorci mesa i mesnih proizvoda s nesukladnim koncentracijama sulfonamida prijavljeni u RASFF sustav u razdoblju 2010. - 2017.

Datum prijave	Članica prijave	Vrsta proizvoda	Sulfonamid i koncentracija (µg/kg)	Zemlja podrijetla
22/11/2017.	Italija	zečje meso	sulfadimetoksin > 150	Italija
24/07/2017.	Italija	svinjetina	sulfadimetoksin 251,5	Italija
10/01/2017.	Italija	svinjske kobasice	sulfadimetoksin 173,6	Italija
06/12/2016.	Belgija	svinjetina	sulfadiazin 241	Belgija
26/09/2016.	Italija	svinjske kobasice	sulfadimetoksin 652	Italija
11/09/2015.	Italija	zečje meso	sulfadimetoksin 300	Italija
11/06/2015.	Francuska	zečje meso	sulfadimetoksin 280	Francuska
28/04/2014.	Belgija	svinjetina	sulfadiazin 280	Belgija
04/12/2013.	Belgija	svinjetina	sulfadiazin 170, 130	Belgija
13/11/2013.	Belgija	svinjetina	sulfadiazin 375	Belgija
05/06/2013.	Italija	svinjetina	sulfadiazin 550	Njemačka
08/03/2013.	Belgija	svinjetina	sulfadimetoksin 200	Belgija
15/01/2013.	Belgija	svinjetina	sulfadiazin 360	Belgija
18/09/2012.	Belgija	svinjetina	sulfadiazin 140	Belgija
24/08/2012.	Italija	ovčje meso	sulfadiazin 154,5	Španjolska
18/04/2011.	Belgija	svinjetina	sulfadiazin > 200	Belgija
04/08/2011.	Italija	teletina	sulfadimetoksin 318	Italija
08/11/2010.	Italija	svinjetina	sulfadimetoksin 263,7	Španjolska

sulfametoksazol (Njemačka) (EFSA, 2017.).

Nesukladne rezultate sulfonamida u kontroli proizvoda tržišta, članice EU prijavljuju u centralni sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje RASFF (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed*) (EC, 2002.b). U razdoblju od 2010. do 2017. godine prijavljeno je ukupno 18 uzoraka mesa i 2 mesna proizvoda (Tabela 4) s nesukladnim koncentracijama višim od 100 µg/kg (RASFF, 2010. - 2017.). Ukupno je prijavljeno 11 uzoraka svinjetine od kojih je 8 s povišenim koncentracijama sulfadiazina u rasponu 130-550 µg/kg i 3 sa sulfadimetoksinom u rasponu 200-263,7 µg/kg. U dva uzorka svinjskih kobasica određene su koncentracije sulfadimetoksina u koncentracijama od 173,6 i 652 µg/kg. U tri zečja mesa podrijetlom iz Italije i Francuske određene su koncentracije sulfadimetoksina u rasponu od 150 do 300 µg/kg. U ovcjemu mesu podrijetlom iz Španjolske određen je sulfadiazin od 154,5 µg/kg, dok je u telećem mesu iz Italije izmjereno 318 µg/kg sulfadimetoksina.

U 2017. godini najviša koncentracija sulfonamida, odnosno sulfadiazina od 1400 µg/kg određena je u hrani za svinje podrijetlom iz Francuske odnosno od 527 µg/kg u ribi *Oreochromis niloticus* iz Kine (RASFF, 2008. - 2017.).

Prikazani rezultati pokazuju da konzumacijom mesa i mesnih proizvoda nema bojazni od izlaganja potrošača povišenim koncentracijama sulfonamida, jer su zapravo jedva mjerljive. Međutim, rezultati na razini EU itekako ukazuju na opravdanost stalne kontrole u ovim vrstama hrane životinjskog podrijetla.

Sažetak

Primjena antibiotika, odnosno sulfonamida u liječenju različitih bolesti životinja koje se koriste za prehranu ljudi može dovesti do pojave njihovih ostataka u tkivima, a mogu završiti i u mesnim proizvodima. Iz tih razloga je

važno praćenje ostataka u hrani životinjskog podrijetla. U ovome istraživanju mjerena je koncentracija sulfonamida u uzorcima mesa i mesnih proizvoda primjenom ELISA metode koja je validirana prema kriterijima Odluke Komisije 2002/657/EC. Utvrđeni su sljedeći validacijski parametri za meso i proizvode: sposobnosti dokazivanja CCβ 60,0 i 11,0 µg/kg; iskorištenje 80,2 i 66,9%; koeficijent varijacije 17,4 i 18,6%; granice detekcije LOD 2,9 i 0,63 µg/kg; granice kvantifikacije LOQ 5,7 i 2,87 µg/kg. Validacijom je potvrđeno da je primjenjivana metoda prikladna za svoju namjenu kvantifikacije sulfonamida u mesu i proizvodima. U ovome istraživanju sakupljeni su uzorci svinjskog i goveđeg mesa te mesnih proizvoda (naresci, kobasice, šunke, paštete) u periodu od 2015. do 2017. godine. U ukupno 535 analiziranih uzoraka, sulfonamidi su određeni u rasponu od 0,32 do 38,9 µg/kg. Nije utvrđen niti jedan rezultat s vrijednostima višim od najviše dopuštene koncentracije (NDK) od 100 µg/kg. Najviša koncentracija od 38,9 µg/kg izmjerena je u uzorku svinjskog mesa u 2015. godini. Ukupne srednje vrijednosti koncentracija sulfonamida u mesu su određene iznad LOD vrijednosti samo u 2015., dok su za mesne proizvode određene u rasponu 1,45 do 2,06 µg/kg. Europska agencija za sigurnost hrane je u izvješćima načinjenim na osnovu nacionalnih planova praćenja ostataka sulfonamida članica EU objavila da je u razdoblju od 2013. do 2015. godine u ukupno 235 uzoraka hrane životinjskog podrijetla utvrđena koncentracija sulfonamida iznad NDK vrijednosti. Nesukladni uzorci prijavljeni su tijekom te tri godine u ukupno 50, 48 i 31 u goveđem mesu i svinjskom mesu. U 2014. godini u Hrvatskoj je utvrđen nesukladni uzorak goveđeg mesa na sulfadiazin. Najveći broj nesukladnih koncentracija u goveđem i svinjskom mesu određen je za sulfonamide: sulfadiazin 48, sulfadimetoksin 25, sulfametazin 17, sulfadimidin 8, sulfadoksin 6, sulfamerazin 4, sulfatiazol 4. Ukupno gledajući sulfadiazin je sulfonamid za koji je utvrđeno ukupno najveći broj od 185 nesukladnih rezultata tijekom perioda 2013. - 2015. Članice EU koriste centralni sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje RASFF za evidentiranje nesukladnih rezultata proizvoda svih veterinarskih lijekova. U razdoblju od 2010. do 2017. godine prijavljeno je ukupno 18 uzoraka mesa (61,1% svinjetine) i 2 mesna

proizvoda s nesukladnim koncentracijama sulfonamida. Najviše određene koncentracije su 550 µg/kg sulfadiazina i 652 µg/kg sulfadimetoksina. Ustvrđeni rezultati određivanja sulfonamida u mesu i mesnim proizvodima u ovome istraživanju pokazuju da nema bojazni od izlaganja potrošača povišenim koncentracijama sulfonamida, jer su jedva mjerljivi. Međutim, rezultati na razini EU ukazuju na opravdanost stalne kontrole u ovim vrstama hrane životinjskog podrijetla.

Ključne riječi: *sigurnost hrane, sulfonamidi, meso, mesni proizvodi, ELISA, validacija*

Literatura

1. BILANDŽIĆ, N., I. VARENINA, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ i B. ŠIMIĆ (2011): Određivanje ostataka sulfonamida u mesu, mesnim proizvodima, ribi i jajima. *Meso* XIII, 430-434.
2. CAMPBELL, K. L. (1999): Sulphonamides: updates on use in veterinary medicine. *Vet. Dermatol.* 10, 205-215.
3. CLARKE, J. U. (1998): Evaluation of censored data methods to allow statistical comparisons among very small samples with below detection limit observations. *Environ. Sci. Technol.* 32, 177-183.
4. EC (1996): Council Directive 96/23/EC of 29 of April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Commun. L* 125, 10-32.
5. EC (2002a): Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun. L* 221, 8-28.
6. EC (2002b): Regulation (EC) No 178/2002 of the European parliament and of the council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Off. J. Eur. Commun. L* 31, 1-24.
7. EC (2010): Council Regulation 37/2010/EU of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun. L* 15, 1-72.
8. ECONOMOU, A., O. PETRAKI, D. TSIPI and E. BOTITSI (2012): Determination of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in honey and validation according to Commission Decision 2002/657/EC for banned compounds. *Talanta* 97, 32-41.
9. EFSA (2015): Report for 2013 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2015:EN-723.
10. EFSA (2016): Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2016:EN-923.
11. EFSA (2017): Report for 2015 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal product. EFSA Supporting publication 2017:EN-1150.
12. EFSA (2018): The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA J. February 2018.
13. GALARINI, R., F. DIANA, S. MORETTI, B. PUPPINI, G. SALUTI and L. PERSIC (2014): Development and validation of a new qualitative ELISA screening for multiresidue detection of sulfonamides in food and feed. *Food Contr.* 35, 300-310.
14. GARCÍA-GALÁN, M. J., M. S. DÍAZ-CRUZ and D. BARCELÓ (2010): Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). *Talanta* 81, 355-366.
15. JANOŠOVÁ, J., I. KOŽÁROVÁ, D. MÁTÉ and M. KOVALIKOVÁ (2007): A comparison of the sensitivity of antibiotic residue screening methods – four plate test (FPT), the screening test for antibiotics residues (STAR), and Premi test to sulphonamide standards. *Meso* IX, 37-43.
16. MULALIĆ, J., L. KOZAČINSKI, A. BENUSSI SKUKAN, I. FILIPOVIĆ i M. RUNJE (2006): Metode utvrđivanja ostataka antibiotika i sulfonamida u mesu. *Meso* VIII, 37-42.
17. RASFF (2008-2017): Rapid alert system for food and feed (RASFF). Dostupno na: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchByKeyword&NewSearch=1&Keywords=chloramphenicol>. Pristupljeno 05.03.2018.
18. SCHNEIDER, M. J., K. MASTOVSKA, S. J. LEHOTAY, A. R. LIGHTFIELD, B. KINSELLA and C. E. SHULTZ (2009): Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum. *Anal. Chim. Acta* 637, 40-46.
19. STUBBINGS, G. and T. BIGWOOD (2009): The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, EASY, CHEap, EFFECTive, RUGged and Safe) approach. *Anal. Chim. Acta* 637, 68-78.
20. ŠEOL, B., K. MATANOVIĆ i S. TERZIĆ (2010): Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Ur. Herak-Perković, V., Medicinska naklada, Zagreb.
21. TAČIĆ, A., V. NIKOLIĆ, LJ. NIKOLIĆ and I. SAVIĆ (2017): Antimicrobial sulfonamide drugs. *Advan. Technol.* 6, 58-71.
22. VARENINA, I., N. BILANDŽIĆ, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ, Đ. BOŽIĆ, M. SEDAK, M. ĐOKIĆ and I. VARGA (2016): Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in muscle, egg, milk and honey. *Food Addit. Contam. A* 33, 656-667.

23. YU, H., Y. TAO, D. CHEN, Y. WANG, L. HUANG, D. PENG, M. DAI, Z. LIU, X. WANG and Z. YUAN (2011): Development of a high performance liquid chromatography method and a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method with the pressurized liquid extraction for the quantification and confirmation of sulfonamides in the foods of animal origin. *J. Chromatogr. B* 879, 2653–2662.
24. ZHANG, W. and S. WANG (2009): Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulphonamide residues in edible animal products. *J. Immunol. Meth.* 350, 1–13.

Sulfonamide residues in meat and meat products over a three-year period

Nina BILANDŽIĆ, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Petra VRKLIJAN, Mag. Eng. Techn. Aliment., Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia; Božica SOLOMUN KOLANOVIĆ, Grad. Food Technology Eng., Ivana VARENINA, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Ines VARGA, Mag. Appl. Chem., Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Marina KR PAN, PhD, Assistant Professor, Mirjana HRUŠKAR, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Full Professor, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia

The usage of antibiotics or sulfonamides in the treatment of various diseases in animals used for human consumption can lead to the appearance of their residues in tissue. As a result, they may also end up in meat products. For these reasons, it is important to monitor residues in food of animal origin. In this study, sulfonamide concentrations were measured in meat and meat product samples using the ELISA method, validated in accordance with the criteria of Commission Decision 2002/657/EC. The following validation parameters for meat and meat products were determined: detection capability (CC β) 60.0 and 11.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; recovery 80.2% and 66.9%; coefficient of variation 17.4 and 18.6%; detection limits (LOD) 2.9 and 0.63 $\mu\text{g}/\text{kg}$; quantification limits (LOQ) 5.7 and 2.87 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Validation confirmed that the method used is suitable for the purpose of quantification of sulfonamide in meat and meat products. In this study, samples of pork and bovine meat and meat products (minced meat, sausages, ham, pâté) were collected in the period from 2015 to 2017. In a total of 535 analysed samples, sulfonamides were determined in the range of 0.32 to 38.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No samples were found with values above the maximum permitted concentration (MRL) of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The highest concentration of 38.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was measured in a sample of pork meat in 2015. Overall concentrations of sulfonamide in meat were determined above the LOD values only in 2015, while for meat products, the range was between 1.45 and 2.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Based on the EU Member States reports on the national monitoring plans of sulfonamide

residues in the period from 2013 to 2015, the European Food Safety Agency reported a total of 235 samples of food of animal origin with non-compliant results above the NDK values for sulfonamide concentrations. Non-compliant results in bovine and pig samples were reported for these three years in a total of 50, 48 and 31 samples, respectively. In 2014, non-compliant sulfadiazine results were found in bovine meat in Croatia. The highest number of non-compliant concentrations in bovine and pig products were determined for sulfonamides: sulfadiazine 48, sulfadimethoxine 25, sulfamethazine 17, sulfadimidine 8, sulfadoxine 6, sulfamerazine 4, sulfathiazole 4. Overall, sulfadiazine is the sulfonamide with the highest number of non-compliant results (185) measured during the period 2013–2015. EU Member States use the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) to record non-compliant product results of all veterinary medicine products. In the period from 2010 to 2017, a total of 18 meat samples (61.1% pork) and 2 meat products with non-compliant concentrations of sulfonamide were reported. The highest concentrations measured were 550 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of sulfadiazine and 652 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of sulfadimethoxine. The results of sulfonamide determination in meat and meat products in this study show that there is no fear of exposure to high concentrations of sulfonamide, as they are barely measurable. However, EU-level results point to the justification of permanent controls for these types of food of animal origin.

Key words: food safety, sulfonamides, meat, meat products, ELISA, validation